



Title	OK-432+fibrinogen+thrombin塞栓療法による宿主免疫賦活作用に関する検討 -OK-432+fibrin存在下でマクロファージ遊走・活性化に注目して-(本文)
Author(s)	佐藤, 哲
Citation	
Issue Date	2016-03-24
URL	<a href="http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/543">http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/543</a>
Rights	Fulltext: Published version is "Cell Immunol. 2016 May;303:66-71. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.03.005. © 2016 Elsevier Inc".
DOI	
Text Version	ETD

OK-432+fibrinogen+thrombin 塞栓療法による宿主免疫賦活作用に関する検討

- OK-432+fibrin 存在下でマクロファージ遊走・活性化に注目して -

福島県立医科大学大学院 医学研究科 病態制御外科学

佐藤 哲

## 概要

### 【背景】

肝細胞癌(HCC)切除後の成績向上のためには、補助療法の開発が必要である。我々は切除可能 HCC に対し、OK-432・fibrinogen・lipiodol を用いた術前動脈免疫塞栓療法 (TIE) を実施し、術後 3 年無再発生存率の有意な改善と腫瘍微小環境の変化(腫瘍内の樹状細胞・細胞障害性 T 細胞の増加と抑制性 T 細胞の減少)、再発予防と免疫の関連性について報告したが、その機序は明らかではない。

### 【目的】

自然免疫に関与するマクロファージ(M $\phi$ )に着目し、TIE の臨床標本、門脈塞栓(PE)rat モデルおよび培養細胞を用いて、fibrinogen+OK-432 の免疫系に与える影響を解析することを目的とした。

### 【方法】

①術前 TIE 後に肝切除術を施行した 13 症例の背景因子および組織所見(HE、化学免疫染色(CD68(全 M $\phi$ )、CD163(M2 M $\phi$ )、CD8))を、手術単独群 13 症例と比較した。②rat 肝片葉 PE モデルで、塞栓物質の違いによる組織変化(HE、fibrin、CD68、CD163)を観察した。塞栓物質は lipiodol (L 群)、lipiodol+OK-432 (L0 群)、lipiodol+fibrinogen (LF 群)、lipiodol+fibrinogen+OK-432 (LF0 群)の 4 種類を使用し、PE 後 1、3、7 日に肝臓を摘出した(各群 n=3)。③fibrin gel を用いた M $\phi$  遊走能評価を行った。2 種類の fibrin gel (OK-432 有/無)を作成し、2 日間培養後、J774(mouse M $\phi$  cell line)の gel 内への遊走を共焦点顕微鏡で比較した。

### 【結果】

①TIE 群の術後 3 年無再発生存率は有意に良好であった(p=0.034)。TIE 群では、腫瘍内に壊死像・多核巨細胞が出現し、CD68 陽性細胞が有意に多く存在し(p<0.01)、腫瘍内・腫瘍周囲肝組織中で CD8 陽性細胞の集積が有意に多かった(p<0.01、p=0.035)。②rat PE モデルでは、4 群とも塞栓薬の広範な肝組織障害を認め、day7 においてはほぼ消失した。肝障害部位への CD68 陽性細胞集積数は、day7 で LF0 群が他群と比較して有意に多いが(p<0.05)、CD163 陽性細胞数の増加を認めなかった。③fibrin gel 中に OK-432 を含むことで J774 の gel 内侵入細胞数が有意に増加した。

### 【結語】

本研究では、fibrinogen と OK-432 の局所投与が M $\phi$  を持続的に活性化し、免疫環境を Th1 にシフトすることが示唆された。免疫抑制状態にある腫瘍微小環境に fibrinogen と OK-432 を局所投与することは、腫瘍微小環境を変化させ、腫瘍に対する免疫誘導を期待しうるものであると考える。

## 略語一覧

CD: Cluster of differentiation

DC: Dendritic cell、樹状細胞

HCC: Hepatocellular carcinoma、肝細胞癌

IL: Interleukin

M $\phi$ : Macrophage、マクロファージ

PE: Portal vein embolization、門脈塞栓

TACE: Transcatheter arterial chemoembolization、肝動脈化学塞栓療法

TAI: Transcatheter arterial infusion、肝動脈動注化学療法

TAM: Tumor-associated macrophage、腫瘍関連マクロファージ

TIE: Transarterial immune-embolization、肝動脈免疫塞栓療法

## 序論

本邦では原発性肝癌は部位別悪性新生物の死亡率で第5位(2013年)<sup>1)</sup>で、その約94%を肝細胞癌(HCC)が占めている。HCCはウイルス、アルコール、糖尿病、脂肪肝などに起因する慢性肝疾患が発生の危険因子とされており、肝予備能および腫瘍因子に応じて治療法が選択される<sup>2)</sup>。最も治療成績の良好である肝切除術の5年生存率が56.8%<sup>3)</sup>であり、更なる治療成績向上が求められている。

HCC外科切除症例の予後因子は術後肝不全と術後再発であり(1、3、5年無再発生存率は68.0%、33.6%、26.3%)<sup>4)</sup>、治療成績向上のためには安全かつ十分な手術と、補助療法の開発が課題である。しかし、術後再発予防として術後補助化学療法<sup>5)</sup>、術前TACE<sup>6)7)</sup>、術後養子免疫療法<sup>8)</sup>が実施されてきたが、2013年版の肝癌診療ガイドラインでは、推奨される補助療法は示されていない<sup>2)</sup>。

OK-432はStreptococcus pyogenes(A群3型)由来の菌体成分であり、抗腫瘍効果および宿主免疫賦活作用を有し、古くから悪性腫瘍治療に用いられている。HCCでもOK-432に着目し、OK-432、fibrinogen、thrombin、lipiodol混合物を用いて腫瘍の栄養血管を塞栓する肝動脈免疫塞栓療法(Transarterial immunoembolization、以下TIE)が検討されてきた<sup>9-11)</sup>。Yoshidaら<sup>11)</sup>が切除可能HCCに対する術前TIEとTACEを比較し、TIEによる直接的な抗腫瘍効果に加え免疫系を介した術後再発抑制の可能性を示している。

当科で切除可能HCCを対象として、術前TIE施行群と手術単独群の治療効果を比較する臨床試験を実施し、術前TIE群では手術単独群と比較して無再発生存率が有意に良好であり、腫瘍内の樹状細胞(Dendritic cell、以下DC)、CD8陽性リンパ球が有意に多く、抑制性Tリンパ球が有意に少なく、Th1 typeの免疫反応が誘導された可能性を報告した<sup>12)</sup>。Th1 typeの免疫環境の誘導にはOK-432により活性化が誘導されたマクロファージ(Mφ)から放出されるサイトカインが関与しているものと予想される。

活性化したMφは一般に、M1とM2に分類され、M1はproinflammatory responseを誘導し、M2はimmunosuppressive responseを誘導する<sup>13)</sup>。悪性腫瘍内にも多くのMφが存在することが明らかとなり、Tumor-associated macrophage(TAM)と呼ばれ、腫瘍発生、発育、転移に係る微小環境の構築に影響を及ぼしている。TAMは一般にM2のphenotypeを示すとされ、腫瘍の宿主免疫系からの回避に関与していると考えられている<sup>14)</sup>。

本研究ではMφに着目して、①術前TIE施行肝切除症例の摘出標本を用いて肝組織中のMφのphenotype(M1、M2)、集積するリンパ球(CD8)を検討すること、②OK-432+fibrinogenによる塞栓の効果をrat門脈塞栓(PE)モデルの肝組織中Mφの経時的変化で解析すること、③OK-432+fibrinogenの共存刺激によるMφ貪食能・遊走能に与える影響についてMφ cell lineを用いてin vitroの系で解析する事を通し、TIEによって誘導される局所免疫応答について解析することを目的とした。

# 目次

## 第 1 部 肝動脈免疫塞栓療法(Transarterial immune-embolization: TIE)

### 実施症例の組織評価

#### 1.1 緒言

#### 1.2 実験方法

##### 1.2.1 肝動脈免疫塞栓療法

##### 1.2.2 対象

##### 1.2.3 組織評価法

##### 1.2.4 統計解析法

#### 1.3 結果

##### 1.3.1 TIE 群と Control 群の背景因子の比較、術後成績の比較

##### 1.3.2 TIE 群と Control 群の組織所見の比較

#### 1.4 考察

## 第 2 部 rat 門脈塞栓モデルによる塞栓後の経時的な肝組織変化

#### 2.1 緒言

#### 2.2 実験方法

##### 2.2.1 rat 門脈塞栓モデル

#### 2.2.2 組織評価方法

#### 2.3 結果

#### 2.4 考察

### 第3部 マウスマクロファージ cell line である J774.1 の遊走・活性化における fibrin、OK-432 の役割

#### 3.1 緒言

#### 3.2 実験方法

#### 3.3 結果

#### 3.4 考察

#### 総括

#### 謝辞

#### 参考文献

#### 図説明 (Figure legends)

## 第 1 部

肝動脈免疫塞栓療法 (Transarterial immune-embolization: TIE)

実施症例の組織評価



## 1.1 緒言

固形癌組織は癌細胞のみならず、様々な非腫瘍性の細胞より形成され、癌細胞の悪性腫瘍としての形質を形成する微小環境が構築されている。M $\phi$  は腫瘍周囲環境を構築する主たる免疫担当細胞であり、環境に応じて抗腫瘍効果・腫瘍増殖のいずれにも作用するといわれており、その phenotype により M1 または M2M $\phi$  に分類される。

術前 TIE を施行した HCC 切除症例では、血中サイトカインおよび腫瘍内浸潤炎症性細胞の検討から Th1 type の免疫反応誘導の可能性が示されたが、腫瘍周囲環境内の M $\phi$  に関しては検討されていない。

本研究は、HCC 腫瘍内および腫瘍周囲肝組織中に存在する M $\phi$  の phenotype、CD8 陽性リンパ球に着目し、TIE 施行症例と非施行症例で比較検討し、TIE による腫瘍周囲環境の変化について検討することを目的とした。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 肝動脈免疫塞栓療法

当科では、福島県立医科大学倫理委員会に平成 16 年 5 月 28 日受付番号 300 として承認を受けた上で、下記の適格基準・除外基準を確認し、切除可能な肝細胞癌患者を対象として術前に肝動脈より OK-432、fibrinogen、lipiodol (±thrombin) を注入する術前免疫塞栓療法(TIE)を実施した。

具体的には、局麻下に鼠径部より右大腿動脈を穿刺し、カテーテルを固有肝動脈に進め、さらにマイクロカテーテルを用いて、腫瘍の栄養血管を同定したのち、塞栓物質を用いて TIE を行った<sup>10)11)</sup>。塞栓物質は、OK-432 と thrombin をそれぞれ 2.5KE/ml、2U/ml に生理食塩水で希釈した solution A と fibrinogen を 60mg/ml に生理食塩水で希釈した solution B を作成し、solution A:solution B:lipiodol を 1:1:0.5 の割合で 30 秒間混和し、30~60 秒かけてゆっくり注入した。しかし、塞栓物質の凝固によりカテーテルが閉塞することから、thrombin の投与法に若干の変更を加えた。TIE 施行後 11~27 日(中央値 20 日)に手術を行い、腫瘍を摘出した(Figure 1)。

適格基準：①組織または血液検査・画像検査で肝細胞癌と診断されている者、②75 歳未満の者、③ECOG Performance Status (PS)が 0-2 の者、④主要臓器の機能が十分保持されている者、⑤患者本人より文書による同意が得られている者。

除外基準：①OK-432 または fibrinogen 製剤によるショックあるいはベンジルペニシリンによるショックの既往歴を有する者、②活動性の感染症を有する者、③重篤な合併症を有する者、④活動性の重複癌を有する者、⑤抗凝固薬・抗血小板薬の内服中止が困難である者、⑥ヨード系造影剤にアレルギーを有する者、⑦中等度以上の腹水・胸水を認める者。

### 1.2.2 対象

2001年から2009年にTIE後に肝切除術を施行したHCC 13症例(TIE群)と、対照として同時期にTIEを施行せずに肝切除を施行したHCC症例13例(Control群)とを抽出し、摘出肝切除標本を用いて、組織学的に比較・検討した。なお、対照は、TIE群と比較して主要な臨床病理学的背景因子に統計学的有意差が無いように抽出した。

### 1.2.3 組織評価法

切除肝組織を10%緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィンブロックを作成し、厚さは3mmで薄切した。組織全般の観察のためにHematoxylin and eosin(H.E.)染色を行い、免疫組織学的検索のため連続切片を作成した。

CD68はM $\phi$ 全般のマーカーであり、CD163はいわゆるM2 M $\phi$ のマーカーとした。リンパ球のマーカーとしてCD8について検討した。抗CD68抗体(Monoclonal mouse anti-human CD68 (PG-M1, Dako, Denmark)、predilutedの抗CD163抗体(Monoclonal mouse, anti-human CD163 antibody (10D6), abcam, UK)、および抗CD8抗体(Monoclonal mouse, anti-human CD8 antibody (C8/144B)、Dako, Denmark)を一次抗体として使用した。内因性ペルオキシダーゼ除去のため3%過酸化水素水処理を行った後、CD68、CD163染色ではマイクロウェーブ(pH 6.0クエン酸Buffer下に15分間加熱処理)で抗原の賦活化を行った後、一次抗体(抗CD68抗体(1:100)、prediluted抗CD163抗体、または抗CD8抗体(1:50))を用いてover-nightで反応した。二次抗体Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / Biotinylated Rabbit F(ab')<sub>2</sub> (1:400, Dako, Denmark)と20分反応し、VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit (VECTOR LABORATORIES, USA)を用いて20分DABで発色した。

OLYMPUS社製倒立型サーチ顕微鏡IX73、顕微鏡用デジタルカメラDP73(ソフトウェア: cellSens standard 1.8.1)を用いて組織学的検討を行った。各切片から腫瘍内部(intra-tumoral)と腫瘍周囲肝組織部(peritumoral liver tissue)の2か所を選択し、倍率400倍(1視野176 $\mu$ m x 132 $\mu$ m)で各5視野を選択し撮影した(Fig. 2)。陽性細胞数のカウントはImageJ 1.48vのCell Counterを使用した。

### 1.2.4 統計解析法

統計学的な解析は、統計解析ソフトはSPSS version22、およびGraphPad Prism5を用いて行った。Shapiro-Wilkの正規性検定を施行後、Spearmanの順位相関係数、t検定、Mann-Whitney検定を用いて有意差の検定を行った。生存率はKaplan-Meier methodで解析した。p<0.05をもって有意差ありと判断した。

## 1.3 結果

### 1.3.1 TIE群とControl群の背景因子の比較、術後成績の比較

TIE 群と Control 群間で比較検討を行った。年齢、性別、肝炎ウイルスの有無、Child-Pugh score (背景因子)、AFP、PIVKA-II、腫瘍個数、腫瘍径、脈管浸潤の有無、進行度：Stage(腫瘍因子)、術式、出血量 (手術因子)、腫瘍組織学的分化度、背景肝組織(組織学的肝炎活動性：A、組織学的線維化：F)の臨床病理学的因子に関して両群間に差を認めなかったが、手術時間のみ TIE 群で有意に短かった (Table 1)。

全症例の観察期間は中央値 1982 日 (1122 日 - 4317 日) であった。両群の 3 年生存率は TIE 群、Control 群ともに 100% (13 症例中 13 例) であったが、術後 3 年無再発生存率に関しては、TIE 群：100% (13 症例中 13 例)、Control 群：69.2% (13 症例中 9 例) であり、TIE 群で有意に良好であった ( $p=0.034$ ) (Fig. 3)

### 1.3.2 TIE 群と Control 群の組織所見の比較

TIE 群の腫瘍内では融解・出血壊死像を認め、多核巨細胞が出現していた。多核巨細胞は 13 例中 10 例出現し、CD68 陽性、CD163 陰性であった (Fig. 4)。

免疫組織化学染色による Mφ に関する両群間の比較では、腫瘍内 CD68 陽性細胞数が TIE 群で有意に多かったが、腫瘍周囲肝組織中の CD68 陽性細胞数、腫瘍内 CD163 陽性細胞数および腫瘍周囲肝組織中 CD163 陽性細胞数では両群間に差を認めなかった (CD68: 腫瘍内 (TIE 群:  $15.1 \pm 9.1$ , Control 群:  $9.7 \pm 4.5$ ,  $p=0.0003$ )、腫瘍周囲肝組織 (TIE 群:  $16.0 \pm 5.4$ , Control 群:  $15.0 \pm 4.3$ ,  $p=0.47$ )、CD163: 腫瘍内 (TIE 群:  $14.0 \pm 9.6$ , Control 群:  $10.7 \pm 6.4$ ,  $p=0.071$ )、腫瘍周囲肝組織 (TIE 群:  $17.6 \pm 6.8$ , Control 群:  $17.1 \pm 5.3$ ,  $p=0.98$ ))。

CD8 陽性細胞は、腫瘍内、腫瘍周囲肝組織共に TIE 群で有意に多かった (腫瘍内 (TIE 群:  $8.2 \pm 15.13$ , Control 群:  $2.1 \pm 3.1$ ,  $p<0.0001$ )、腫瘍周囲肝組織 (TIE 群:  $3.4 \pm 3.7$ , Control 群:  $2.2 \pm 2.5$ ,  $p=0.035$ )) (Fig. 5)。腫瘍内外の比較では TIE 群、Control 群共に有意差を認めなかった (TIE 群:  $p=0.11$ , Control 群:  $p=0.22$ )。

## 1.4 考察

TIE 群では、Control 群と比較して、腫瘍内において CD68 陽性細胞数が有意に多く、CD163 陽性細胞は有意差を認めないことから M1Mφ が増殖していること、腫瘍内・腫瘍周囲肝組織中の CD8 陽性リンパ球が有意に多いことを確認し、Th1 type の免疫反応が腫瘍局所で惹起された可能性が示された。

HCC と TAMs に関する検討では、汎 Mφ のマーカーである CD68 で評価し、腫瘍内もしくは腫瘍周囲肝組織中の TAMs 細胞数が予後 (全生存率もしくは無再発生存率) と逆相関すると報告されている<sup>15)16)</sup>。TAMs は腫瘍増殖に好ましい環境整備に関与するとされ、TAMs が腫瘍増殖抑制を目的とした治療のターゲットとして注目されている<sup>14)17)</sup>。

癌に対する OK-432 と fibrinogen を組み合わせた治療は、これまで大腸癌・HCC で実施され、炎症が長期に持続し、腫瘍壊死に伴う腫瘍縮小効果が得られている<sup>18)</sup>。OK-432 が Toll like receptor を介して単球、Mφ、樹状細胞等を活性化し、腫瘍に対する免疫応答を誘導する可能性が示唆されている<sup>10)11)</sup>。

今回の TIE 群の切除標本の観察では、腫瘍組織内に出血・融解壊死像および多核巨細胞の出現を認め、腫瘍内浸入 CD68 陽性細胞数は Control 群と比較して有意に増加していた。出血・融解壊死像は TIE による動脈塞栓効果に起因すると考えられる。多核巨細胞の出現および腫瘍内 CD68 陽性細胞の増加に関しては、活性化した Mφ の集積による変化を示唆すると考える。多核巨細胞は、炎症巣からの化学遊走因子(サイトカインやケモカイン)で動員された Mφ より形成されることが一般的で、CD163 陰性であるとの報告があり<sup>19)</sup>、今回の免疫組織化学染色での検討でも CD68 陽性・CD163 陰性であり、M1 Mφ の可能性がある。また、TIE 施行後手術までの期間は中央値で 20 日であることから、この変化は比較的長期間持続していると考えられる。また、CD8 陽性細胞は TIE 群で腫瘍内外共に増加しており、活性化 Mφ による T 細胞の活性化が示唆され、Th1 型免疫反応が腫瘍内にとどまらず腫瘍周囲組織まで波及していることが示唆された。

本研究での問題点は、塞栓物質に thrombin を混ぜた場合にカテーテル内で凝固することがあり、臨床医の判断で TIE の塞栓物質が症例により変更されていた。約半数の症例では thrombin なしで塞栓が施行されたが、thrombin の有無で組織障害や集積細胞数に差を認めなかったことから、今後は手技の統一を考慮し、塞栓物質に thrombin を含めずに検討することが必要であると考ええる。また、塞栓物質の違いによる塞栓後の経時的な組織障害部位の変化を検証する必要があるが、臨床例では実施困難である。

上記問題点を解消するため、門脈を塞栓する動物モデルを用いて、OK-432 + fibrinogen の組み合わせの意義について次の研究で検証する。

## 第 2 部

rat 門脈塞栓モデルによる塞栓後の経時的な肝組織変化

## 2.1 緒言

fibrin+OK-432 の癌への投与はこれまで、肝細胞癌<sup>11)12)</sup>、大腸癌<sup>18)</sup>、乳癌<sup>20)</sup>、胃癌<sup>21)</sup>に対して行われ、組織学的検討でMφが集積し、Th1 type responseを誘導しIV型アレルギー反応をきたす可能性が示された。前項で示した術前TIE後の摘出肝組織を用いた検討でも同様の結果が示されたが、塞栓物質が症例により異なることが問題であり、治療効果を評価するためには、塞栓物質の統一が必要であり、thrombinを除いた塞栓物質の使用を検討している。

本研究では、塞栓物質としてOK-432, fibrinogenの組み合わせによる組織変化を検討することを目的とする。4種類の異なる塞栓物質を用いてratにPEを施行し、肝組織障害・炎症性細胞浸潤の経時的变化を観察し評価する。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 rat 門脈塞栓モデル

**実験動物**:Wistar rat (週数8~22week male、体重163~478g、購入 Charles river)。

**実験施設**:福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設。

**塞栓物質**:fibrinogen (ベリプラストP® (1ml、CSL ベーリング))・OK-432(ピシバニール® 5KE、中外製薬株式会社)・lipiodol (リピオドール®480 注、テルモ株式会社)の混和物を作成する。TIE臨床例に準じてfibrinogen (60mg/ml)、OK-432 (2.5KE/ml)、およびlipiodol を1:1:0.5の割合で混ぜて使用した<sup>11)12)</sup>。

PEに使用する塞栓物質を下記の4種類作成した。①lipiodol 群(L群)、②lipiodol+OK-432 群(L0群)、③lipiodol+ fibrinogen 群(LF群)、④lipiodol+ fibrinogen+ OK-432 群(LF0 群)。塞栓物質は、含有する物質の濃度を一定にするため、不足分は生理食塩水で塞栓物質の総量を調節した。

**塞栓術**:肝右葉を塞栓する片葉塞栓モデルにて実験を行った。イソフルランにて全身麻酔を導入し、上腹部を消毒した後、上腹部正中を小開腹した。小開腹部からペントバルビタールを40~50mg/kg 注入し、麻酔を維持した。上腹部正中で開腹し、肝臓、腸間膜を牽引し、門脈を露出し、左肝外側葉に流入する門脈をブルドック鉗子でクランプし、門脈を22Gサーフロー針で穿刺し、外筒を右門脈に進め、塞栓物質を注入した。X線写真でPE部位を確認した後、腹部を3-0絹糸で連続縫合し、閉腹した。

### 組織採取法

PE後1、3、7日後に肝臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、病理検査に供した(各群n=3)。non treated群から摘出した肝組織をコントロールとして、以下の免疫組織化学染色で比較検討した。

### 2.2.2 組織評価方法

**免疫組織化学染色**:肝組織は固定後にソフテックス(EMT-R 特型、ソフテックス株式

会社)を用いて軟 X 線撮影を行い塞栓物質の残存を確認した後、パラフィンに包埋し、パラフィンブロックを作成し、厚さは 3mm で薄切し、組織評価を行った。

一般的観察のために H. E. 染色を行い、免疫組織学的検索のため連続切片を作成した。抗 fibrin 抗体 (Fibrinogen、Dako, Denmark)、CD68 染色 (ED1、AbD Serotec, UK)、CD163 染色 (ED2, SANTA CRUZ, USA) を一次抗体として使用した。内因性ペルオキシダーゼ除去のため 3%過酸化水素水処理を行った後、CD68, CD163 染色ではプロテアーゼ K (pH7.8、0.05MTris Buffer 下に 5 分間室温にて反応) で抗原の賦活化を行った後、一次抗体 (抗 fibrinogen 抗体 (1:400)、抗 CD68 抗体 (1:100)、または抗 CD163 抗体 (1:50)) を用いて over-night で反応した。抗 fibrin 染色では 2 次抗体として Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated Swine F(ab')<sub>2</sub> (Dako, Denmark) と 20 分反応し、VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit (VECTOR LABORATORIES, USA) を用いて 20 分 DAB で発色した。CD68、CD163 染色ではヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (M) (ニチレイ、日本) を用いて DAB で発色した。

**陽性細胞数測定** : OLYMPUS 社製 倒立型サーチ顕微鏡 IX73、顕微鏡用デジタルカメラ DP73、cellSens standard 1.8.1 を用いて組織標本を撮影した。撮影部位は、最も細胞が集積している部位を倍率 400 倍 (1 視野 176  $\mu$ m x 132  $\mu$ m) で各 5 視野ずつ撮影し、CD68 または CD163 染色陽性細胞数を ImageJ 1.48v の Cell Counter を使用してカウントした。

**統計処理** : 統計学的な解析は、Shapiro-Wilk の正規性の検定、t 検定、Mann-Whitney 検定、Kruskal-Wallis 検定を用いた。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 を用いて行い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判断した。

## 2.3 結果

### 門脈塞栓による肝障害部位の評価

PE 後の肝組織を示す。肝組織障害部位は H. E 染色で評価した。Day1 では HE 染色で認めた肝障害部位と抗 fibrinogen 染色陽性領域がほぼ一致していた。Day1 の肝組織は、4 群とも門脈内に血栓の形成と広範な肝組織障害を認めた。HE 染色での評価では、day1 で最も広範な組織障害を認め経時的に障害領域が縮小し、day7 においてはほぼ消失していた。それに併せて抗 fibrinogen 染色陽性領域も縮小していた (Fig. 6)。

### 免疫組織化学染色の評価

#### CD68 陽性細胞

CD68 陽性細胞数は、塞栓後 day1, 3, 7 において 4 群ともに Control 群と比較して有意に増加していた。day1 では、L0 群が他群より有意に多く、day3 では L0 群が他群より有意に少なく、day7 では LF0 群が他群よりも有意に多い結果であった (day1 L 対 L0 :  $p = 0.0001$ 、L0 対 LF :  $p = 0.0008$ 、L0 対 LF0 :  $p = 0.0016$ 、day3 L 対 L0 :  $p = 0.0041$ 、

L0 対 LF : $p=0.0011$ 、L0 対 LF0 : $p=0.0003$ 、day7:L 対 LF0 : $p<0.0001$ 、L0 対 LF0 : $p<0.0001$ 、LF 対 LF0 : $p=0.0440$  (Fig. 7)。塞栓物質別の経時変化を Figure 8 に示す。L0 群では day1 に peak となり、その後減少したが、L 群・LF 群・LF0 群では day3 が peak となっていた。

### CD163 陽性細胞

CD163 陽性細胞数は、塞栓後 day1, 3, 7 において 4 群ともに Control 群と比較して有意に増加していたが、CD68 陽性細胞数と比較して少数であった。day1, day3 では 4 群間に差を認めず、day7 では L0 群が L 群・LF 群より、LF0 群が L 群より有意に少なかった (day7: L 対 L0 : $p=0.0012$ 、L0 対 LF : $p=0.0080$ 、L 対 LF0:  $p=0.0124$ ) (Fig. 7)。塞栓物質別の経時変化では、全ての群で day3 が peak であった (Fig. 8)。

## 2.4 考察

PE を行うことで、4 群とも day1 で広範な組織障害を認めたが、経時的に障害領域が縮小し、day7 においてはほぼ消失していた。PE の際に、lipiodol に加え、fibrinogen、OK-432 を併せて用いることで塞栓部位への CD68 陽性細胞の集積が持続した。

TIE 後の組織変化が塞栓物質の違いに起因していると考え、lipiodol、fibrinogen および OK-432 を用いた塞栓実験を計画した。研究の目的が、血管塞栓に伴う経時的な肝組織障害および同部位への炎症性細胞浸潤の変化を観察することあり、rat の PE モデルで評価可能と判断し実施した。文献的には、ゼラチンを含浸およびコーティングしたアクリル系共重合体である Microspheres を用いている PE の場合、肝組織壊死は PE 後 1 日がピークであり、7 日後には線維化も残さずほぼ消失したと報告され<sup>22)</sup>、Ethanol で PE した場合は、門脈内に新鮮血栓が 14 日以上にわたって充満し塞栓葉の壊死が持続すると報告され<sup>23)</sup>、塞栓物質の違いにより門脈内血栓の塞栓葉の組織障害の経時的な変化も異なっていた。

本研究では 4 種類の塞栓物質を用いて検討を行った。Day1 において、いずれの群も門脈内に血栓の形成を認めた。血栓を形成する機序としては、①lipiodol による類洞内での血流うっ滞を生じ、②OK-432 による炎症反応に起因する組織浮腫に加え、③fibrinogen の投与による局所での fibrin 網形成が関与しているものと考えた。一方、day7 では組織障害部位は縮小していたが、正常の類洞構造であれば①lipiodol は短期間 (数日以内) で肝静脈に流れること、②類洞が門脈と動脈双方からの血液の流入があることで一過性の組織変化であったと考える。

肝組織内の CD68 陽性細胞数の経時的な変化に関しては、L0 群では day1 が最多で、経時的に減少したのに対して、L 群・LF 群・LF0 群では day3 が最多であった。Shi らは rat に OK-432 を静注した際に肝内の Kupffer 細胞・monocyte は急激に増加し 36 時間でピークを迎えることを示している<sup>24)</sup>。OK-432 は lipiodol に溶解しないため、L0



群では OK-432 の門脈内注入による影響で day1 での細胞数が最多になったと考えられる。

L 群、LF 群、LF0 群では day3 で CD68 陽性細胞の集積が最多であり、PE 後の血栓形成による組織障害が生じたため、3 日目が細胞浸潤のピークを迎えるものと考えられる。一方、day7 において LF0 群の塞栓部位への CD68 陽性細胞の集積が他群と比較して有意に増加したことに関しては、門脈内に投与した fibrinogen+OK-432 の併用による影響と考える。今回の研究では thrombin を用いず、fibrinogen のみを投与したが、摘出した肝組織を検討すると、門脈内に血栓が形成され、肝小葉内において抗 fibrin 抗体で染色される領域が存在していた。内因性の thrombin もしくは血中のセリンプロテアーゼなどの影響で fibrinogen が重合し fibrin 網を形成した可能性がある。Fibrin は gel 化した状態で薬剤を徐放する基剤として作用するとして臨床応用されており<sup>25)</sup>、OK-432 が fibrin gel に含まれることで Mφ 集積遷延の原因となりうると考える。

一方、CD163 陽性細胞は 4 群とも PE により増加は認めたが、CD68 陽性細胞と比較して変化率が低率であったことから、免疫抑制性 Mφ の動員が主たるものではないと予想される。Figure8 に示すように、今回の研究では、CD68 陽性細胞の経時的変化が主であり、M1Mφ の経時的変化を示唆するものと考えた。

本研究では、正常肝組織の門脈塞栓を用いた観察である。血管塞栓とそれによる早期の自然免疫系の反応を観察するモデルとしては評価可能であると考えるが、その後の獲得免疫との関連について考察することは困難である。今後は、担癌モデルを用いた実験を計画し、評価することが必要である。

次の研究では、fibrin 網と OK-432 の併存による Mφ への影響について cell line を用いた in vitro の系で検討する。

### 第 3 部

マウスマクロファージ cell line である J774.1 の遊走・活性化に  
おける fibrin、OK-432 の役割

### 3.1 緒言

前項では塞栓物質の組成の違いによる影響を観察し、lipiodol, OK-432, fibrinogen の全てを使用した群で、M $\phi$  の集積の持続を認めた。fibrinogen は A $\alpha$ 、B $\beta$ 、 $\gamma$  鎖の 3 種のポリペプチド鎖で構成される物質であり、thrombin により A $\alpha$ 、B $\beta$  鎖が切断され互いに重合し、最終的に立体構造となり、fibrin となる<sup>26)</sup>。fibrin はその構造的な特性から混合した薬剤の徐放効果を示すことから、臨床応用が研究されている<sup>27)</sup>。TIE においても、OK-432 が fibrin 内に取り込まれることにより、徐放効果から免疫誘導が持続する可能性が有る。

今回は、OK-432 が混在する fibrin gel の構造の観察と、fibrin gel の M $\phi$  に与える影響について検討することを目的とした。

### 3.2 実験方法

**培養細胞：**J774.1 (単球・M $\phi$  様細胞株, BALB/c mouse、理研)。

**培養培地：**RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) medium with 10% Fetal bovine serum (ニチレイバイオサイエンス)、100 U of penicillin /ml、100 mg of streptomycin /ml (Sigma-Aldrich)

**実験培地：**RPMI 1640 without phenol red (Sigma-Aldrich)、5% Fetal bovine serum (ニチレイバイオサイエンス)

**実験手順：**

fibrin clot の作成には、fibrinogen・thrombin (フィブリン糊 (1ml、CSL ベーリング) (ベリプラス P®)) を用いた。OK-432 (5KE (0.5mg/ml)、中外製薬株式会社) (ピシバニール®) は蛍光走査顕微鏡での観察に備え、Alexa Fluor® 647 色素 (Life Technologies) で標識、J774.1 は緑色蛍光タンパク質 (mVenus) を導入した。

fibrin gel の作成は、走査電子顕微鏡 (JEOL JSM-5800、日本電子、日本) 下で段階希釈した fibrin gel の形態を観察し、fibrinogen を 8 倍希釈して作成することとした。培地で 8 倍希釈した fibrinogen 溶液に Alexa647 で赤外蛍光標識した OK-432 (最終濃度 5KE/ml) と、thrombin (最終濃度 0.6U/ml) 加えた後、4well 35mm dish に 50ml 注入し、25°C で 1 時間放置し作成した (OK 群)。対照群では、OK-432 を含まない fibrin gel を作成し、培養上清に OK-432 を OK 群と同量混合した (Control 群)。

**貪食像の観察：**培養細胞  $2.5 \times 10^5$  / 100ul を各 well に注入し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下に 48 時間培養を行った後、走査電子顕微鏡下で観察を行った。

**貪食の経時的観察：**同様の手順で 40 時間共焦点顕微鏡 (A1si、Nikon、日本) の加温保湿されたステージ上で培養を行い、連続撮影を行った。

**遊走能の観察：**培養終了後、4%PFA/0.25M HEPES-Na pH7.2 を用いて 4°C で一晩固定、Hoechst33258 (同仁化学研究所、日本) を 10ug/ml の濃度で溶解した PBS を用いて室温で一晩染色し、洗浄した後に fibrin gel の一定の領域をカバーガラス面から最上部まで断

層撮影して J774.1 の位置を確認した。fibrin gel 内に侵入した細胞数の測定は、3D Collagen Matrix を使用した migration assay<sup>28)</sup>を参考とし、fibrin 表面に付着した細胞を除き fibrin 内部の四角柱(縦: 124  $\mu$ m、横: 124  $\mu$ m、高さ: fibrin 表面から最低 10  $\mu$ m を除き dish 底面まで)に含まれる細胞数を 5 カ所測定し、遊走能の評価とした。

**統計処理:** 統計学的な解析は、Mann-Whitney 検定を用いた。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 を用いて行い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判断した。

### 3.3 結果

走査電子顕微鏡を用いて fibrin gel の観察を行った。fibrin 濃度を 1 倍～16 倍まで希釈して fibrin clot の構造を確認した。fibrin 濃度を希釈すると内部の網目構造が徐々に粗となり、gel 化は 8 倍希釈までであったため、今回の実験では 8 倍希釈した fibrin gel を使用することとした。また、OK-432 を混合し fibrin gel を走査電子顕微鏡で観察し、fibrin 網に結合した OK-432 を確認した。

8 倍に希釈した fibrin gel を用いて J774.1 と培養した結果、J774.1 が fibrin gel の表面だけではなく、内部に侵入していることを電子顕微鏡で観察した (Fig. 9)。さらに 20 分おきに 40 時間連続撮影し、J774.1 が fibrin gel 内に侵入、OK-432 を貪食するとともに fibrin gel が縮小することを確認した (Fig. 10)。

Control 群と OK 群の 2 群間で gel 内浸入細胞数をカウントする実験を 5 回施行し、OK 群で Control 群と比較して有意に多いことを確認した ( $p = 0.001$ ) (Fig. 11)。

### 3.4 考察

本研究では、OK-432 を含有する fibrin gel は fibrin 網に OK-432 がトラップされていることを電子顕微鏡で確認するとともに、OK-432 を fibrin gel 中に含有することで M $\phi$  の活性化が亢進されることを明らかにした。活性化の観察は、fibrin 内に侵入する M $\phi$  数を計測して遊走能を指標として用いた。

OK-432 は M $\phi$  を活性化し、Th1 型免疫応答を誘導する事が知られている<sup>29)</sup>ため、OK-432 を混合し希釈した fibrin gel を用いて、培養液上清中の IL-6 の測定を行ったが、培養上清では上昇を認めなかった。そこで M $\phi$  遊走能を評価した fibrin gel を用いて IL-6 の免疫染色を検討したが、染色性の問題で数値化して評価することは困難であった。また、遊走能の指標として dish 上を移動する M $\phi$  の移動距離を数値化する事も検討したが、ランダムに移動する M $\phi$  の計測が困難であったため、侵入 M $\phi$  数を指標とした。

本研究において使用した M $\phi$  は、研究に必要な細胞数を得るため、増殖が容易な BALB/c mouse 由来マクロファージ様細胞である J774.1 を使用した。免疫的に活性化する事でサイトカインを放出するが、不死化細胞であり、正常の M $\phi$  とは放出するサイトカインが同一ではなく<sup>30)</sup>、今後はヒト単球/M $\phi$  を分離し使用する事も検討している。

今後は fibrin 内に侵入した Mφ がどのように活性化されているかを、Th1 型免疫反応に関わるサイトカインである IL-6・IL-12 や、白血球の遊走を亢進させるケモカインである CXCL9・10 の放出を観察すること、自然免疫が作動した証拠であり、獲得免疫の橋渡しとなる TLR2・4 や獲得免疫のための抗原提示に必要な補助刺激分子である CD80・CD86 の表面マーカーの発現を観察すること、侵入細胞の mRNA の発現プロファイルを microarray で比較検討することで、免疫系への関与について解析を行う必要がある。

## 総括

本研究ではMφに着目し、①HCCの切除標本を用いて術前TIE施行肝切の有無による肝組織中に集積するMφ(M1, M2)およびリンパ球(CD8)の違いを検討すること、②rat PEモデルでOK-432+fibrinogenによる効果を肝組織中Mφの経時的变化で解析すること、最後に、③OK-432+fibrinogenの共存刺激によるMφ貪食能・遊走能に与える影響についてMφ cell lineを用いてin vitroの系で解析し、TIEによって誘導される局所免疫応答について解析することを目的とした。

第1部の研究からは、TIE群では、Control群と比較して、CD68陽性細胞数が有意に多いこと、さらに、腫瘍内のみならず腫瘍周囲肝組織中のCD8陽性リンパ球が有意に多いことが明らかとなり、自然免疫系の活性化に引き続き、細胞障害性T細胞の集積が腫瘍内部から腫瘍周囲にも及んでいる可能性が示唆された。

第2部の研究からは、塞栓物質にfibrinogenとOK-432を含むことで、塞栓部位へのMφの遊走を促進することが予想された。また、Mφの表面マーカーの解析から、障害組織部位へ集積したMφはM1Mφである可能性が示唆された。

第3部の研究からは、fibrin内にOK-432を含むことで、fibrin網内に侵入するMφが増加し遊走能が亢進したことを証明した。

以上の3つの研究から、OK-432とfibrinogenを混合して血管内に投与することにより組織に障害が生じ、同部位へMφを主体とする貪食細胞が侵入することを確認した。通常、悪性腫瘍内にはTAMと呼ばれるimmunosuppressiveで腫瘍増殖に寄与するMφが存在し、主にM2 phenotypeであるといわれているが、TIE症例の組織及びラット門脈塞栓モデルでの検討では、CD163と比較してCD68陽性細胞が多く集積し、また、TIE症例の腫瘍内外組織中でCD8陽性細胞が増加していたことから、fibrinogenおよびOK-432の局所投与により腫瘍周囲環境がTh1にシフトした可能性が示唆され、TIEによる再発抑制効果との関連が示唆される。

しかし、今回の研究では、免疫染色による評価や細胞浸潤による評価が主体であり、細胞の機能的な評価は行っていない。今後は、サイトカイン・ケモカイン測定、表面マーカーの観察、mRNA microarrayによる侵入したMφの機能的な解析やCD8細胞の抗原特異的な解析による抗腫瘍免疫誘導を証明する必要がある。

本研究では、fibrinogenとOK-432の局所投与が、Mφを持続的に活性化し、免疫環境をTh1にシフトすることが示唆された。免疫抑制状態にある腫瘍微小環境にfibrinogenとOK-432を局所投与することは、環境に変化をきたし、腫瘍に対する免疫誘導を期待しうるものであると考える。

## 謝辞

今回の学位論文作成にあたり、後藤満一教授（臓器再生外科学講座）、和田郁夫教授（生体情報伝達研究所細胞科学部門）、町田豪助教（免疫学講座）に多大なるご指導を賜った。また、土屋貴男先生（臓器再生外科学講座）、見城明先生（臓器再生外科学講座）、木村隆先生（臓器再生外科学講座）、佐藤直哉先生（臓器再生外科学講座）を初め、当講座研究室の諸先生方に御指導、御鞭撻を賜った。さらに、研究室の技師である井日出美さん、菊田有希子さん、大友栄子さんにご協力を頂いた。ここに感謝の意を表します。

## Uncategorized References

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部編: 人口動態統計. 2013.
- 2) 日本肝臓学会編: 肝癌診療ガイドライン 2013 年版. 2013.
- 3) 日本肝癌研究会事務局編: 第 19 回全国原発性肝癌追跡調査報告. 日本肝癌研究会事務局. 2014.
- 4) Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, Giovanelli M, Benetti A, Tiberio GA et al: Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Ann Surg*. 2006 Feb;243(2):229-35.
- 5) Hasegawa K, Takayama T, Ijichi M, Matsuyama Y, Imamura H, Sano K et al: Uracil-tegafur as an adjuvant for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Hepatology*. 2006 Oct;44(4):891-5.
- 6) Harada T, Matsuo K, Inoue T, Tamesue S, Inoue T, Nakamura H: Is preoperative hepatic arterial chemoembolization safe and effective for hepatocellular carcinoma? *Ann Surg*. 1996 Jul;224(1):4-9.
- 7) Shi HY, Wang SN, Wang SC, Chuang SC, Chen CM, Lee KT: Preoperative transarterial chemoembolization and resection for hepatocellular carcinoma: a nationwide Taiwan database analysis of long-term outcome predictors. *Journal of surgical oncology*. 2014 Apr;109(5):487-93.
- 8) Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J et al: Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 2000 Sep 2;356(9232):802-7.
- 9) 坂本一夫, 佐古正雄, 広田省三, 他: OK-432 混和塞栓物質による肝癌の治療. *日本癌治療学会誌*. 1987 1987.08;22(7):1373-84.
- 10) Kanai T, Monden M, Sakon M, Gotoh M, Umeshita K, Hasuike Y et al: New development of transarterial immunoembolization (TIE) for therapy of hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastases. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1994;33 Suppl:S48-54.
- 11) Yoshida T, Sakon M, Umeshita K, Kanai T, Miyamoto A, Takeda T et al: Appraisal of transarterial immunoembolization for hepatocellular carcinoma: a clinicopathologic study. *Journal of clinical gastroenterology*. 2001 Jan;32(1):59-65.
- 12) Saito T, Tsuchiya T, Sato Y, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T et al: Effect of Transarterial Immunoembolization as Preoperative Treatment for Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Cancer Research and Therapy*. 2011 2011/07/20;19(1):26-33.
- 13) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004 Dec;25(12):677-86.



- 14) Sica A, Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Mar 1;122(3):787-95.
- 15) Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP et al: High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. *Human pathology*. 2009 Mar;40(3):381-9.
- 16) Kong LQ, Zhu XD, Xu HX, Zhang JB, Lu L, Wang WQ et al: The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2013;8(3):e59771.
- 17) Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I et al: Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014 Aug 15;135(4):843-61.
- 18) Monden T, Morimoto H, Shimano T, Yagyu T, Murotani M, Nagaoka H et al: Use of fibrinogen to enhance the antitumor effect of OK-432. A new approach to immunotherapy for colorectal carcinoma. *Cancer*. 1992 Feb 1;69(3):636-42.
- 19) Weiss LM, Chu PG, Lau SK: CD163: A Specific Marker of Macrophages in Paraffin-Embedded Tissue Samples. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;122(5):794-801.
- 20) Takeda T, Kobayashi T, Monden T, Katsumoto Y, Ito Y, Wakasugi E et al: The effect of local immunotherapy for breast cancer using a mixture of OK-432 and fibrinogen supplemented with activated macrophages. *Biotherapy*. 1993;7(1):47-54.
- 21) Takeda T, Wakasugi T, Katsumoto Y, Sakita I, Nagaoka H, Morimoto H et al: [Effect of intratumoral injection of the mixture of OK-432 and fibrinogen (OK/fbg) on gastric cancer]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*. 1992 Aug;19(10 Suppl):1458-60.
- 22) Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, Jochum W, El-Badry AM, Graf R et al: Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1615-23.
- 23) Ogasawara K, Uchino J, Une Y, Fujioka Y: Selective portal vein embolization with absolute ethanol induces hepatic hypertrophy and makes more extensive hepatectomy possible. *Hepatology*. 1996 Feb;23(2):338-45.
- 24) Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K: Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology*. 1996 Nov;24(5):1256-63.
- 25) Anai S, Hide T, Takezaki T, Kuroda J, Shinojima N, Makino K et al: Antitumor effect of fibrin glue containing temozolomide against malignant glioma. *Cancer science*. 2014 May;105(5):583-91.

- 26) 竹尾和寛, 中垣智弘, 岩永貞昭: 凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構 フィブリノゲンの多様性 その構造と機能、および分子進化について. 日本血栓止血学会誌. 2013 2013.06;24(3):300-17.
- 27) 杉立彰夫, 高金明典, 寺島雅典, 柏葉匡寛, 島田裕, 旭博史 et al: フィブリン塊を担体とした Cis-Platinum 放出機序の解析. 癌と化学療法. 2000 2000.10;27(12):1861-4.
- 28) Burgstaller G, Oehrle B, Koch I, Lindner M, Eickelberg O: Multiplex profiling of cellular invasion in 3D cell culture models. PloS one. 2013;8(5):e63121.
- 29) Fujimoto T, Duda RB, Szilvasi A, Chen X, Mai M, O'Donnell MA: Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state. Journal of immunology. 1997 Jun 15;158(12):5619-26.
- 30) Saito S, Matsuura M, Hirai Y: Regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production by activation of repressor element GA-12 through hyperactivation of the ERK pathway. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2006 Aug;13(8):876-83.

## Figure legends

### Figure 1: 肝細胞癌に対する術前肝動脈免疫塞栓療法

選択された肝細胞癌患者に対して、経肝動脈的に OK-432・fibrinogen・thrombin・lipiodol を用いた動脈塞栓術(TIE)を実施し、その後に肝切除を実施した。

### Figure 2 : 術前 TIE 症例の肝組織の免疫組織化学染色

代表的な HCC 症例の組織像を示す(弱拡大(x16)、HE 染色)。T:腫瘍内部、C:被膜、H:腫瘍周囲肝組織部)。T および H 部の CD68、CD163、CD8 免疫染色の代表的な組織像をそれぞれ示す(強拡大(x400))。

### Figure 3: 肝細胞癌切除症例の 3 年無再発生存率及び全生存率

TIE 施行群と TIE 非施行群の 3 年無再発生存率(A)、全生存率(B)。TIE 群 : 太線、Control 群 : 細線。\*は  $p < 0.05$ 。

### Figure 4: TIE 群腫瘍部の多核巨細胞

TIE 群の腫瘍組織所見を示す(A: H.E 染色(x200)、B: CD68(x200)、C: CD163(x200))。A に相当する部位が B、C である。多核巨細胞を赤矢印で示す。

### Figure 5: 腫瘍内・腫瘍周囲肝組織中のマクロファージ細胞数の比較(TIE 群 vs Control 群)

TIE 群と Control 群の摘出標本で腫瘍内および肝組織中の CD68, CD163, CD8 陽性細胞数を比較した(CD68: A & D, CD163: B & E, CD8: C & F)。

グラフは平均値±SD。\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$ 。

### Figure 6: rat 門脈塞栓による肝障害部位の経時変化

L 群 : lipiodol のみ、LO 群 : lipiodol+OK-432, LF 群 : lipiodol+fibrin, LFO 群 : lipiodol+fibrin+OK-432。Day1: HE 染色、抗 fibrin 染色、Day7: 抗 fibrin 染色。

### Figure 7: rat 肝組織障害部の CD68/CD163 陽性細胞数の経時変化

PE 後 1 日目 (Day1)、3 日目 (Day3)、7 日目 (Day7) に肝組織障害部位へ集積する CD68 (A, B, C), CD163 (D, E, F) 陽性細胞数を塞栓物質の違いで比較した。

平均値±SD、\*は  $p<0.05$ 、\*\*は  $p<0.01$ 。#は Control 群が PE 群と比較して有意に細胞が少ないことを示している ( $p<0.01$ )。

**Figure 8: 門脈塞栓物質別の CD68・CD163 陽性細胞数の経時変化**

L 群 (A), LO 群 (B), LF 群 (C), LF0 群 (D)。

**Figure 9: Fibrin gel の観察**

(走査電子顕微鏡写真)

A: Fibrin gel 内の OK-432 を撮影。黄矢印: OK-432。

B: OK-432 混合 fibrin gel と J774.1(\*) (x450)。

C: B の拡大像 (x1100)。fibrin 網の中に結合する J774.1 を確認。

**Figure 10: OK-432 混合 fibrin gel を用いた J774.1 の食食能観察**

fibrinogen に OK-432 を混合した gel を作成し、J774.1 と共培養し蛍光顕微鏡下に 40 時間連続で撮影した写真を示す。緑: J774.1。赤: 標識した OK-432。左上の数字: 撮影からの経過時間。写真に付記した。

**Figure 11: Fibrin gel を用いたマクロファージ遊走能評価**

A: Control 群 (gel: fibrin のみ, 培養液: RPMI1640 +OK-432)、B: OK 群 (gel: fibrin+OK-432, 培養液: RPMI1640) に J774.1 を加え培養。

C: Control 群の細胞浸潤写真。 D: OK 群の細胞浸潤写真。

E: gel 内へ侵入した Mφ 細胞数の比較。平均値±SD、\*\*は  $p<0.01$ 。

## Figure 1. 肝細胞癌に対する術前肝動脈免疫塞栓療法

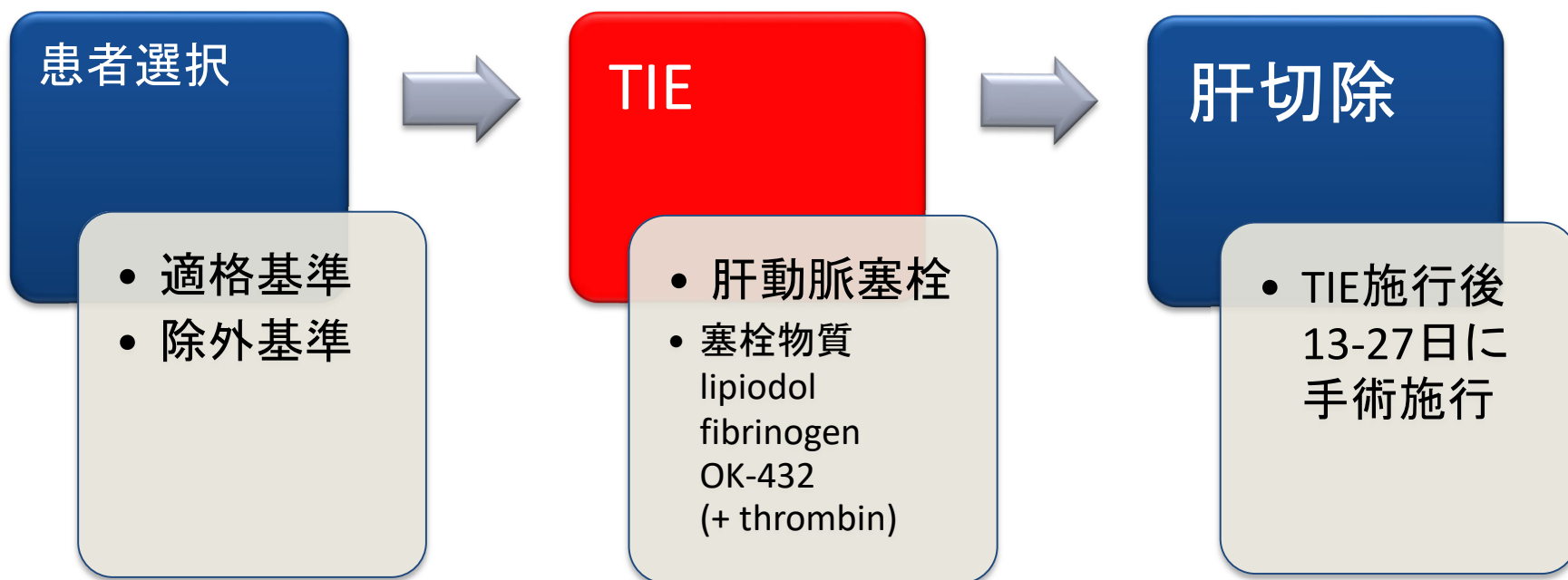


Figure 2. 術前TIE症例の肝組織の免疫組織化学染色

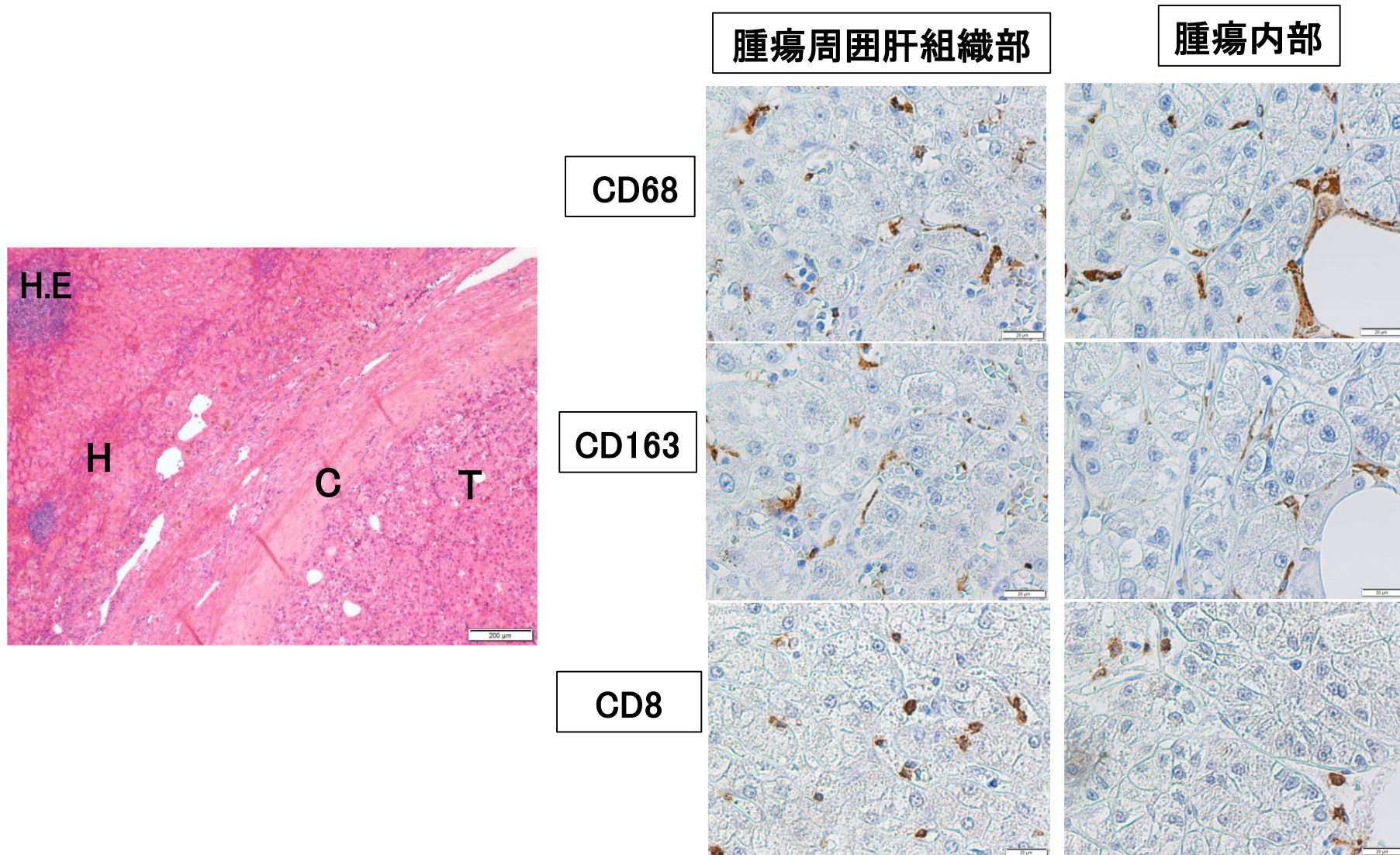


Figure 3. 肝細胞癌切除症例の3年無再発生存率・全生存率

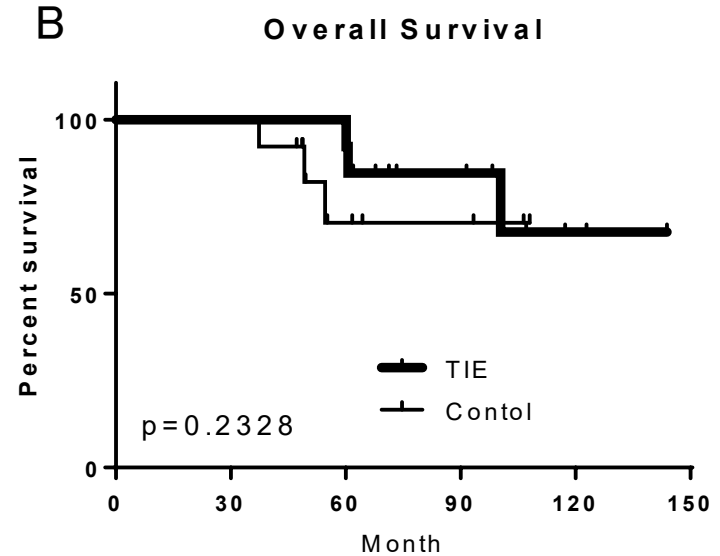
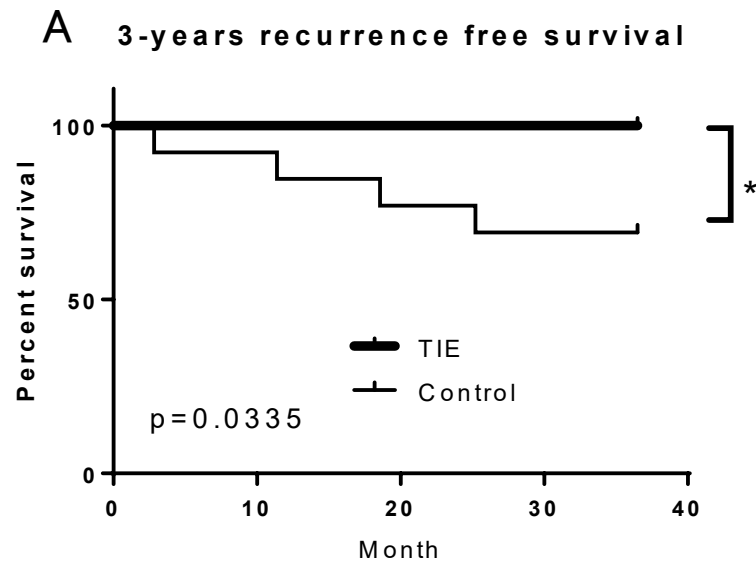
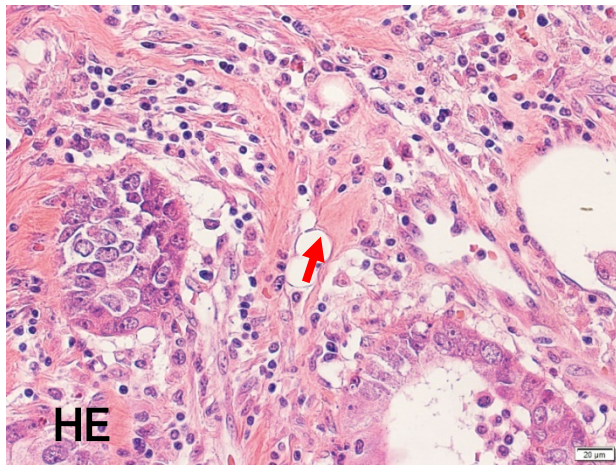


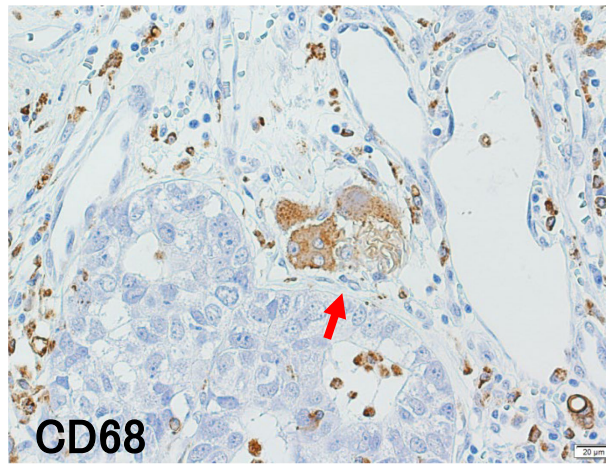


Figure 4. TIE群腫瘍部の多核巨細胞

A



B



C

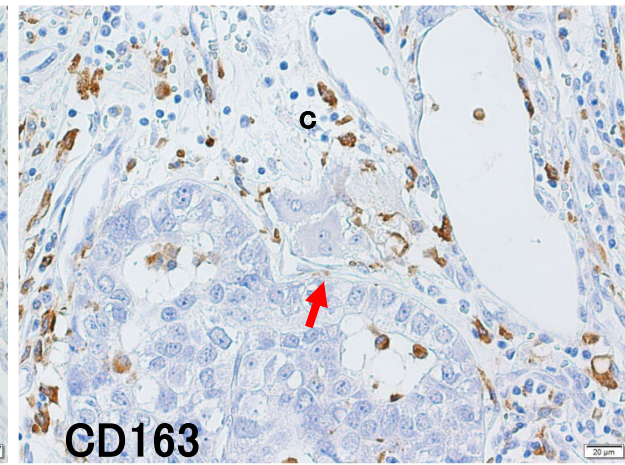




Figure 5.腫瘍内・腫瘍周囲肝組織中のマクロファージ細胞数の比較  
(TIE群 vs Control群)

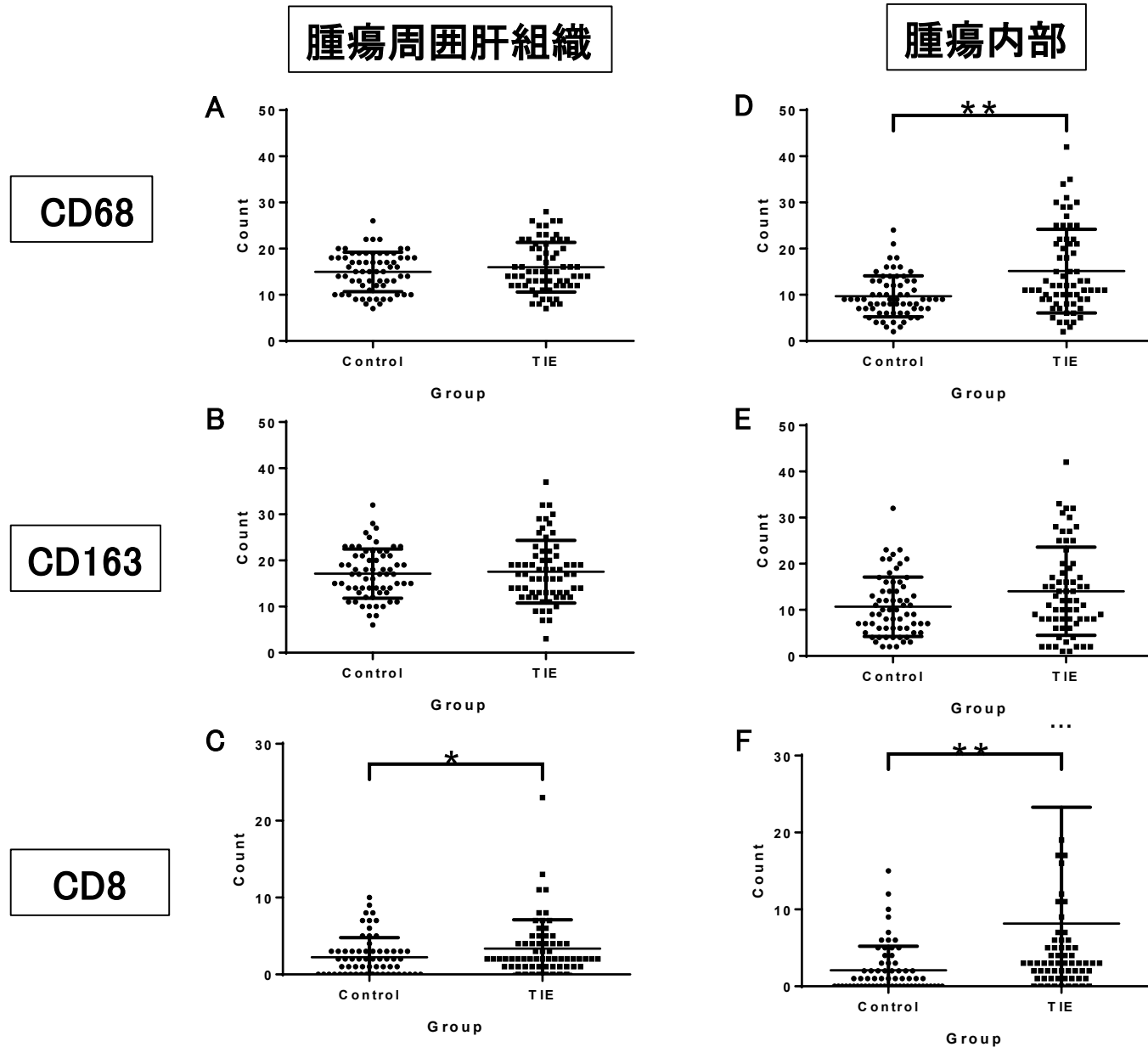


Figure 6. rat門脈塞栓による肝傷害部位の経時変化

L群

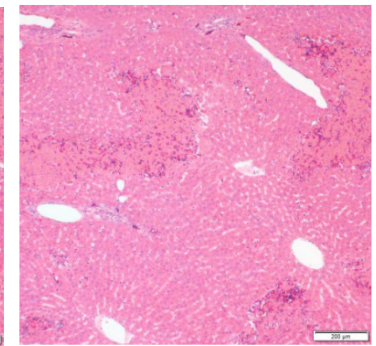
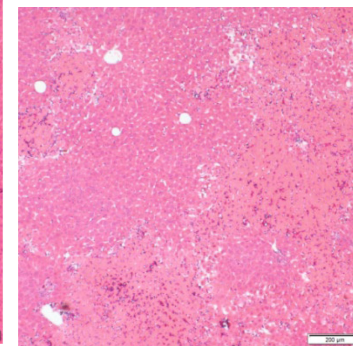
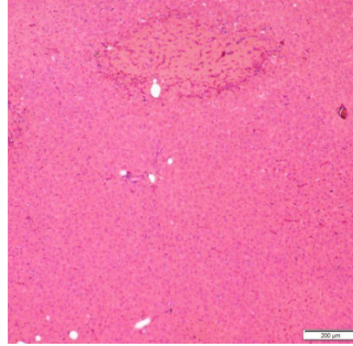
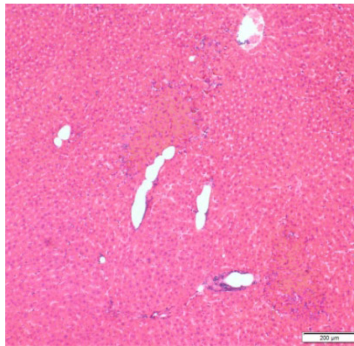
LO群

LF群

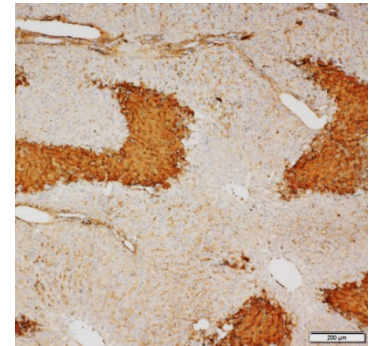
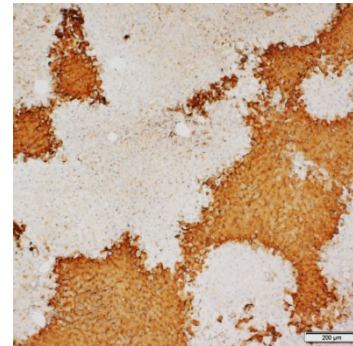
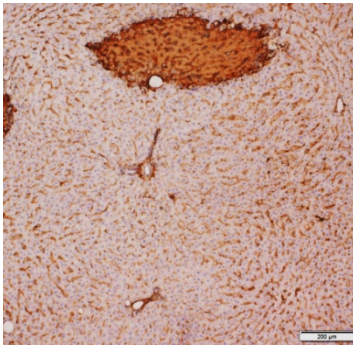
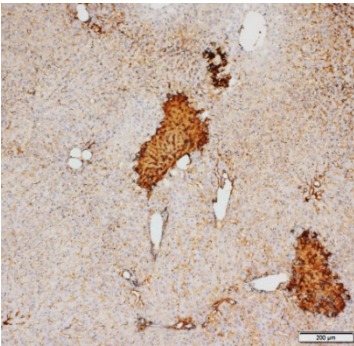
LFO群

Day 1

H.E

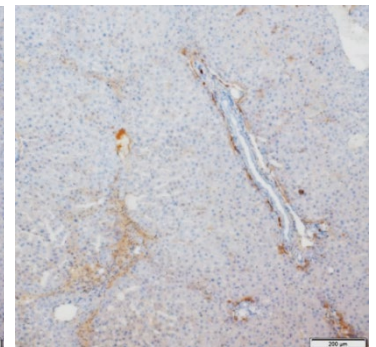
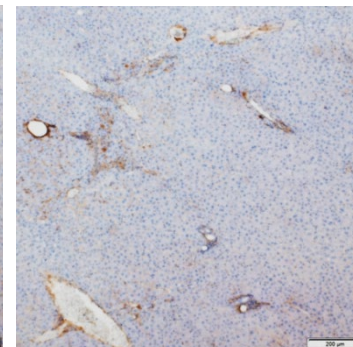
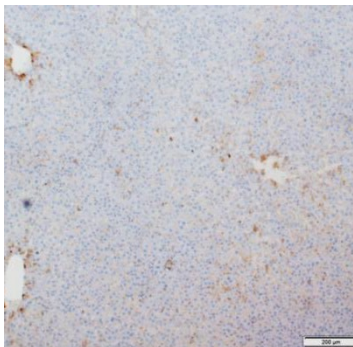
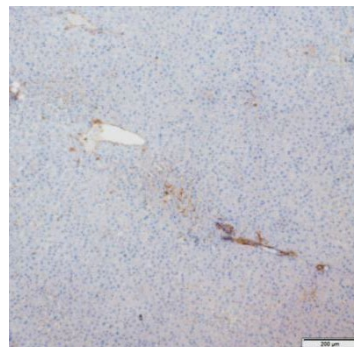


fibrin染色



Day 7

fibrin染色



# Figure 7. rat肝組織障害部のCD68/CD163陽性細胞数の経時変化

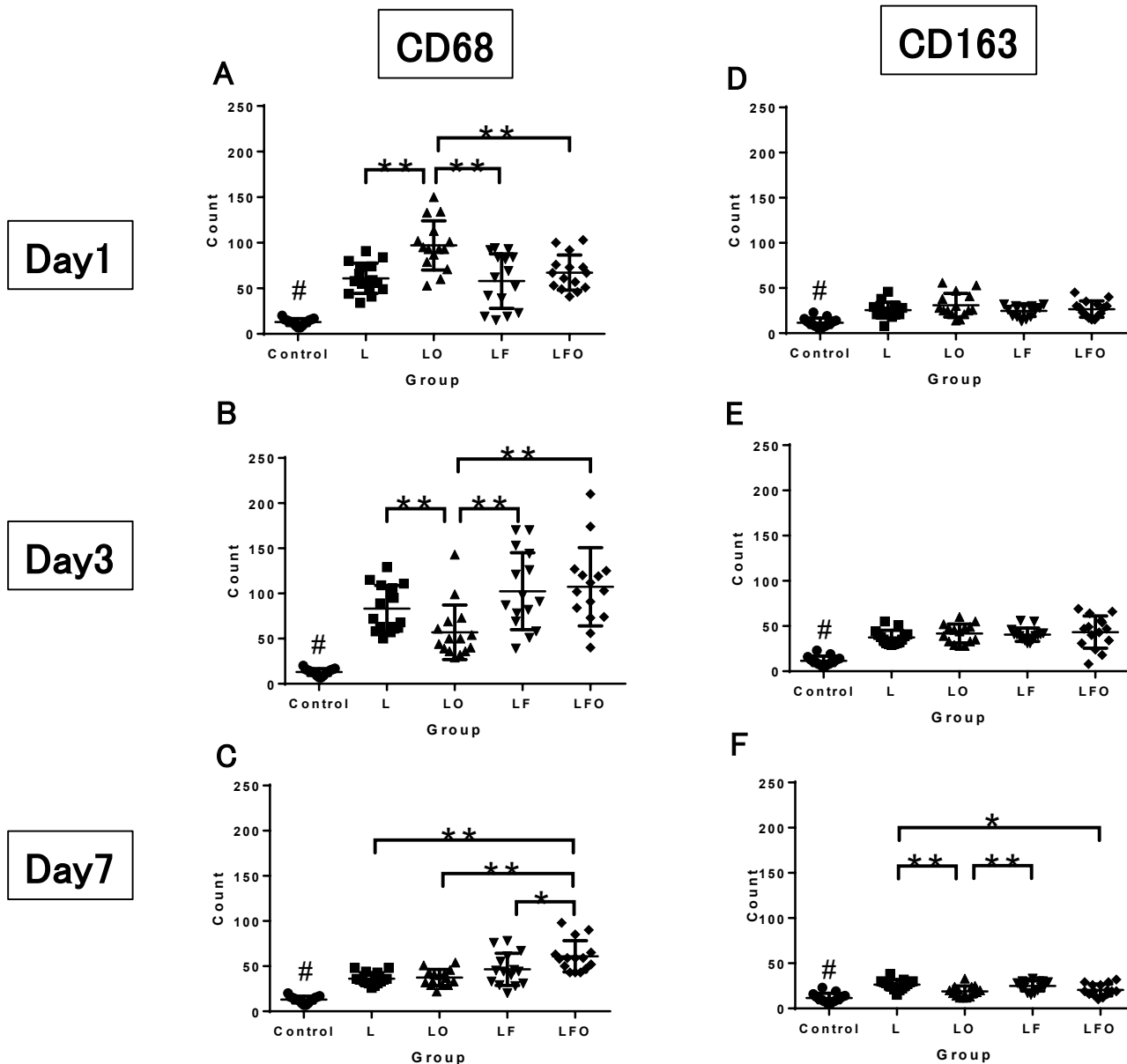
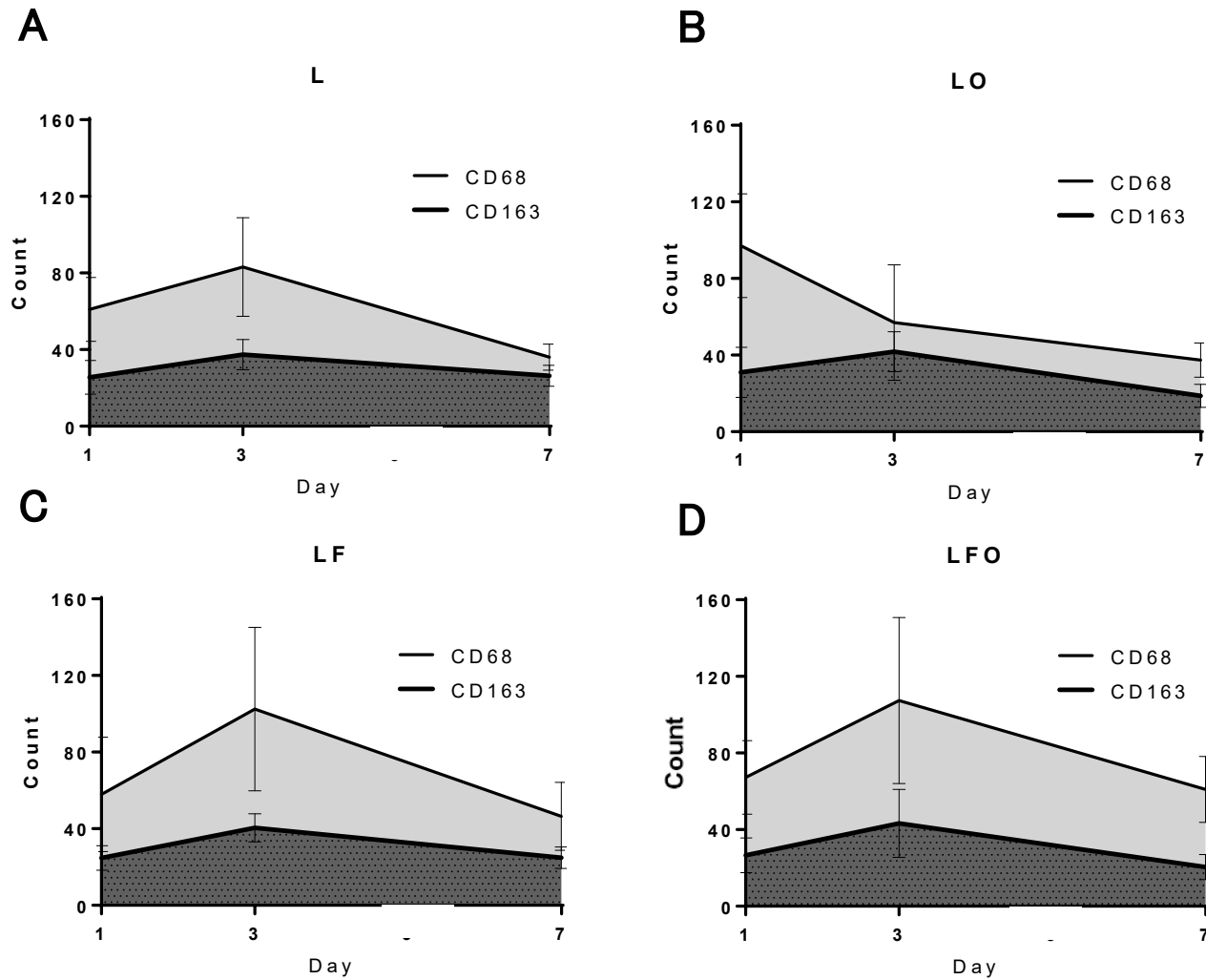
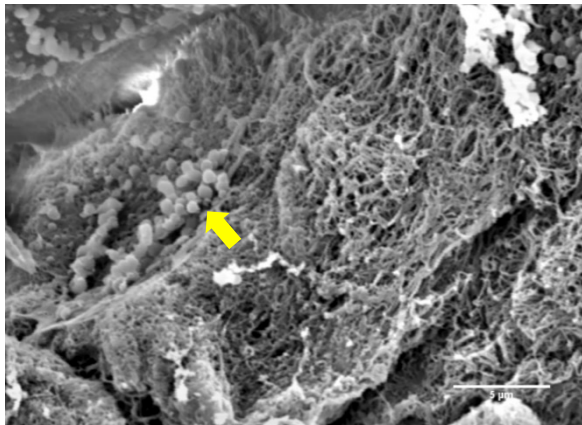


Figure 8. 門脈塞栓物質別のCD68・CD163陽性細胞数の経時変化

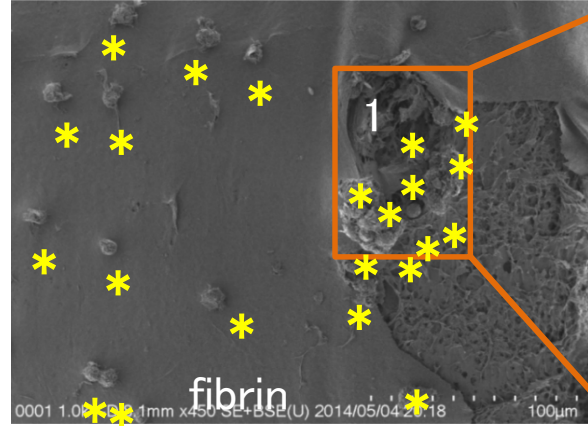


## Figure 9. fibrin gelの観察(走査電子顕微鏡写真)

A



B



C

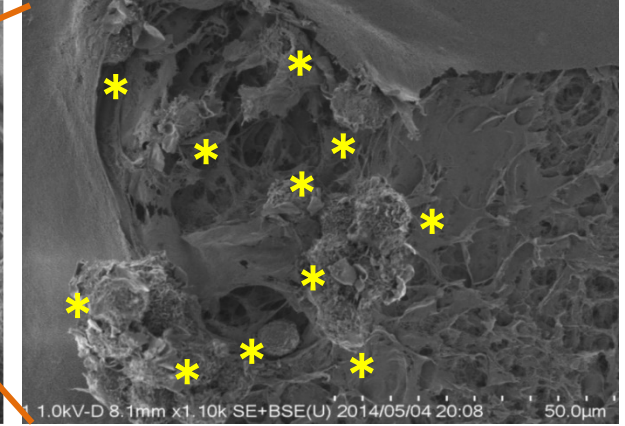




Figure 10. OK-432混合fibrin gelを用いたJ774.1の  
貪食能観察

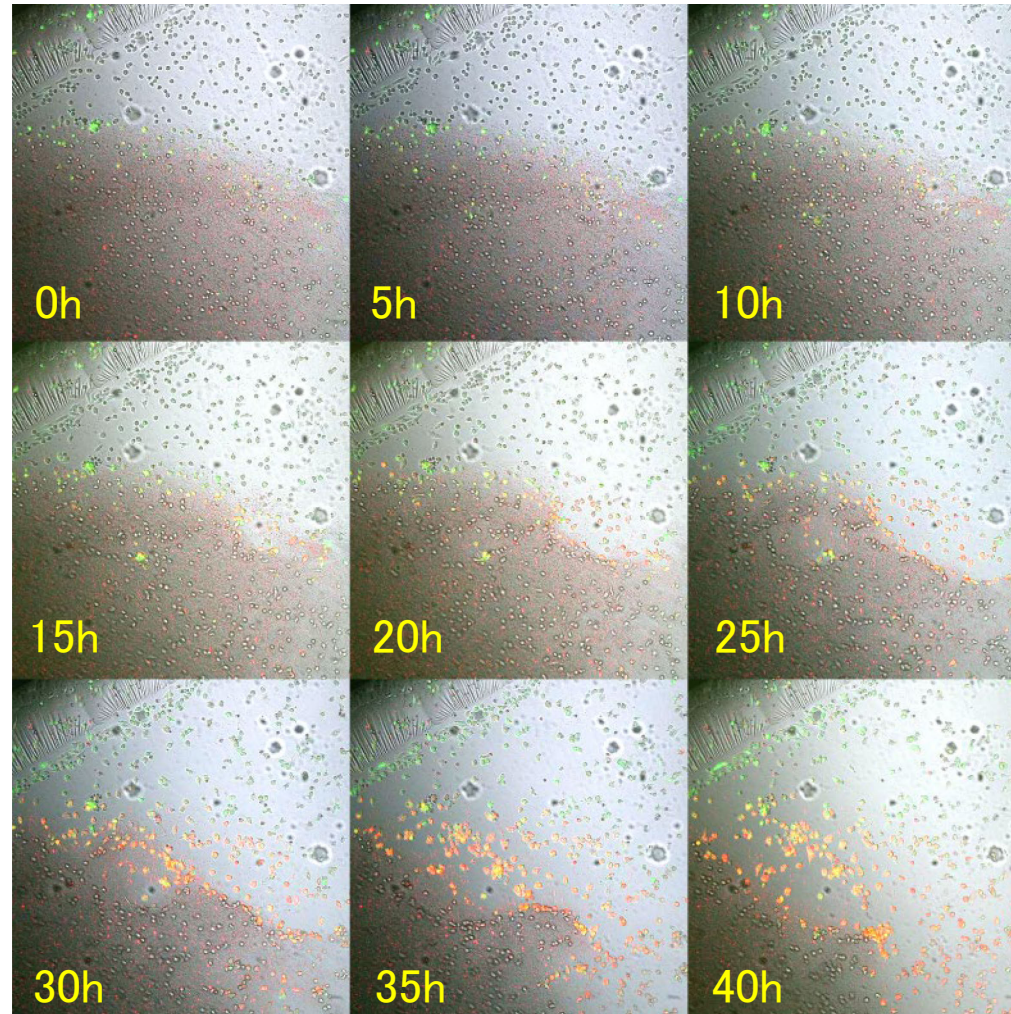
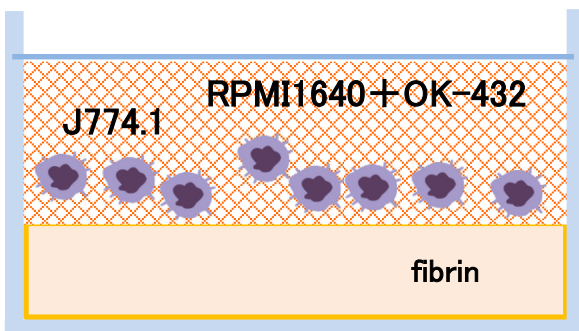
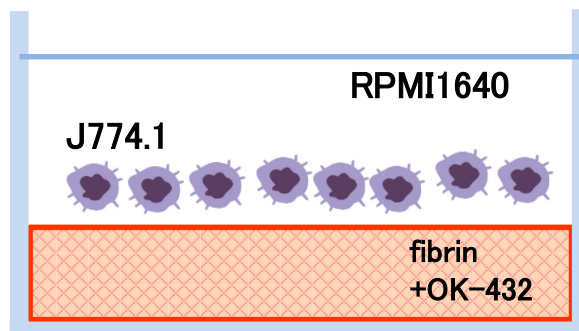


Figure 11. fibrin gelを用いたマクロファージ遊走能評価

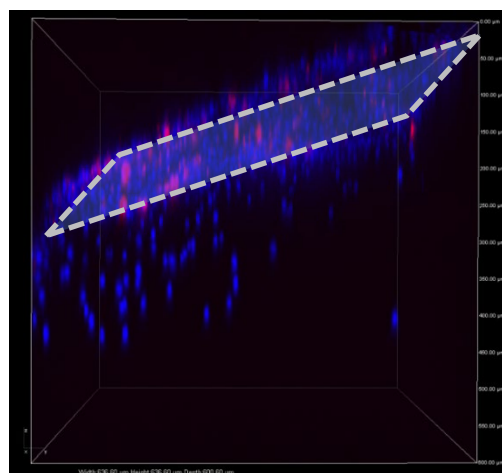
A



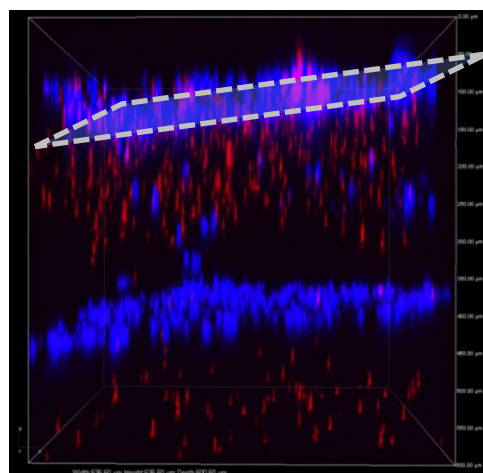
B



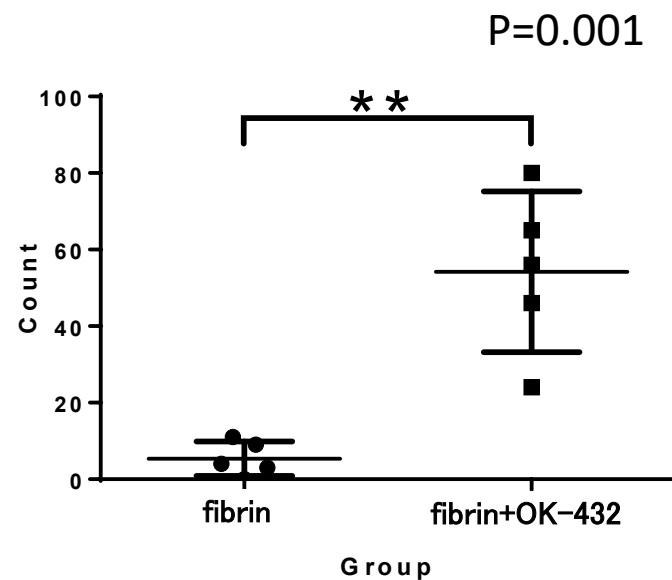
C



D



E



# Table 1. TIE施行群/Control群 背景因子

因子		TIE群 (n=13)	Control群 (n=13)	P
年齢	中央値 (y.o. min-max)	64(46-74)	65(46-77)	0.761
性別	(男/女)	10/3	10/3	1.000
肝炎ウイルス	(HBV/HCV/none)	2/7/4	7/4/2	0.064
Child-Pugh score	(A/B/C)	13/0/0	13/0/0	-
AFP	中央値 (ng/ml, min-max)	24.6(2.9-6077.5)	11.4(2.3-1503.0)	0.479
PIVKA II	中央値 (mAU/ml, min-max)	208(10.0-5840.0)	34(12.0-4033.0)	0.204
腫瘍個数	(単発/多発)	10/3	11/2	0.635
腫瘍径	中央値 (cm, min-max)	3(1.5-9.0)	3.5(1.8-8.0)	0.920
脈管浸潤	(無/有)	11/2	9/4	0.204
Stage	( I / II / III / IV)	0/10/3/0	2/7/3/1	0.906
術式	(亜区域以下/区域/葉 切除)	6/4/3	2/7/4	0.204
手術時間	中央値 (min, min-max)	304(139-439)	430(157-535)	0.014
出血量	中央値 (g, min-max)	1090(210-3540)	1195(240-2990)	0.691
腫瘍組織分化度	(高分化/中分化/低分化)	2/10/1	4/8/1	0.459
組織学的肝炎活動性	(A0/1/2/3/4)	0/12/0/1/0	0/9/4/0/0	0.196
組織学的線維化	(F0/1/2/3/4)	0/5/4/4/0	1/7/3/1/1	0.236
3年以内再発	(無/有)	13/0	9/4	0.030